

文章编号: 1674 - 5566(2010)06 - 0734 - 05

三疣梭子蟹雌雄个体遗传差异的 SRAP 分析

胡则辉^{1,2}, 徐君卓¹, 王跃斌¹, 柴学军¹

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增殖重点实验室, 浙江 舟山 316100;

2. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 应用三疣梭子蟹 SRAP-PCR 优化体系, 从 88 个 SRAP 引物组合中筛选出 17 个组合对三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 雌、雄个体遗传差异进行分析, 共获得 146 个位点, 雌性个体获得 139 个位点, 多态位点比例为 69.78%; 雄性个体检测到 129 个位点, 多态位点比例达 79.07%。雌性和雄性的 Nei's 基因多样性分别为 0.231 5 和 0.268 2, Shannon's 信息指数为 0.347 8 和 0.402 6, 雌雄个体间的相似系数为 0.595 9 ~ 0.841 7, 遗传距离为 0.158 3 ~ 0.404 1。用 TFPGA 软件绘制了个体间的聚类图。另外在 5 个 SRAP 选择扩增组合中发现了 6 个位点在雌雄个体间扩增差异较大, 其中 4 个位点显性条带个体为雄性的比例为 12.5% ~ 20%; 2 个位点显性条带个体为雌性的比例为 100%。

关键词: 三疣梭子蟹; 雌雄个体; 遗传差异; SRAP

中图分类号: S 917 文献标识码: A

SRAP analysis of genetic variation between female and male swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

HU Ze-hui^{1,2}, XU Jun-zhuo¹, WANG Yue-bin¹, CHAI Xue-jun¹

(1. Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhejiang Key Laboratory of

Mariculture & Enhancement, Zhoushan 316100, China;

2. College of Life Science & Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Using the SRAP-PCR optimization system for *P. trituberculatus*, this study applied sequence-related amplified polymorphism (SRAP) technique with 17 primer pairs screened out of 88 primer combinations to analyze the genetic variation of female and male populations. 146 loci were obtained and the percentage of polymorphic loci was 69.78% in female population and 79.07% in male population. Nei's gene diversity was 0.231 5 and 0.268 2, Shannon's information index was 0.347 8 and 0.402 6. Genetic similarity index ranged from 0.595 9 to 0.841 7 and the genetic distance was 0.158 3 to 0.404 1 between female and male. A dendrogram was constructed using TFPGA. 6 loci were identified from 5 primer combinations. Male genotype is dominant in 4 loci, whose ratio was 12.5% and 20%, and female ratio was 100% in dominant individuals of 2 loci.

Key words: *Portunus trituberculatus*; female and male; genetic diversity; SRAP

收稿日期: 2010-04-08

基金项目: 浙江省重大农业科技专项(2007C12024)

作者简介: 胡则辉(1978-),男,工程师,在读博士生,主要从事海水养殖与海洋生物技术方面的研究。E-mail: zhhu0813@yahoo.com.cn

通讯作者: 徐君卓, E-mail: 3013095@163.com

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus* Miers)在我国分布较广,常见于中国沿海,是我国重要的大型海产经济蟹类,营养价值和经济价值较高,其肉质细嫩,味道鲜美,雌蟹养殖经济效益更胜于雄蟹。梭子蟹由于性别分化造成的营养差异和经济差异已得到关注,王春琳等^[1]开展了物理方法诱导梭子蟹的雌性化,而生产上实现梭子蟹的单性养殖也是近期研究的课题。

SRAP 标记 (Sequence-related amplified polymorphism) 是 Li 和 Quiros^[2] 新发展的一种分子标记技术,针对基因外显子中 GC 含量丰富而启动子、内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物进行 PCR 扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性,该标记具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段的特点,已被应用于图谱构建^[2-4]、基因定位^[4]、遗传多样性^[5-7]和性别鉴定^[8]分析中。近年来,RAPD 和 AFLP 标记技术已分别被用于中华绒螯蟹^[9]和锯缘青蟹^[10]的性别特异性标记的研究,但 SRAP 标记应用于蟹类的性别鉴别研究尚属首次报道。本文从分子水平上对梭子蟹雌雄个体进行性别鉴定的研究,旨在为梭子蟹性别控制、单性养殖

以及克隆与性别相关的基因奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

梭子蟹采自舟山市普陀区东河菜场,雌雄个体各取 10 只,雌蟹体重 50~100 g,雄蟹体重 100~150 g。

从大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 购置 Taq DNA 酶和标准分子量 (Marker) DL2000 marker。其他常用的化学试剂购自上海生物工程有限公司。

1.2 DNA 提取

取活体螯肢肌肉,采用高盐法^[11]进行基因组 DNA 的提取,取等量的 DNA 混合,构建雌、雄梭子蟹 DNA 基因池。

1.3 实验引物

依照 Li 等^[2]提交发表的引物,选用了 8 个正向引物 (me1~me8) 和 11 个反向引物 (em1~em8) (表 1),由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 SRAP 正向引物和反向引物

Tab.1 SRAP forward primer and reverse primer

正向引物	反向引物
me1: 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	me2: 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
me3: 5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	me4: 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'
me5: 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	me6: 5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'
me7: 5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	me8: 5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'
em1: 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'	em2: 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
em3: 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'	em4: 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
em5: 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'	em6: 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
em7: 5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'	em8: 5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'
em9: 5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3'	em10: 5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3'
	em11: 5'-GACTGCGTACGAATTTCCA-3'

1.4 PCR 反应体系

基于正交试验设计 $L_{16}(4^5)$ 在 4 个水平上进行实验,优化并建立了三疣梭子蟹 SRAP-PCR 最佳反应体系 (25 μ L): 10 \times Buffer 2.75 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 U,模板 10 ng,dNTPs 0.20 mol/L,引物 0.20 μ mol/L,不足部分用 ddH₂O 补齐。

1.5 PCR 扩增程序选择

在 My CyclerTM thermal cycler 仪 (BIO-RAD,

USA) 上进行 SRAP-PCR 扩增,反应程序参照王燕青等^[12]提供的程序。

1.6 SRAP 产物的检测

取 8 μ L PCR 产物与 6 \times loading buffer 混匀,上样于 1.5% 进口琼脂糖凝胶 (含适量 EB) 于 5 V/cm 电压下电泳 (在 0.5 \times TBE 缓冲液中检测)。电泳结束后在凝胶成像系统中观察拍照。

1.7 数据分析

数据分析使用 PopGene (Version 3.2) 统计多态位点比例, 基因多样性指数等, 使用 TFGPA 软件进行 UPGMA 法 (Unweighted pair group method with arithmetic means) 构建梭子蟹雌、雄个体间的聚类图。

2 结果

2.1 SRAP 引物筛选

选用 8 个正向 (上游) 引物和 11 个反向 (下游) 引物 (表 1) 组合成 88 对 SRAP 引物, 对雌、雄梭子蟹基因组 DNA (DNA Pool) 进行扩增, 共筛选出 17 个引物组合能够扩增出清晰、稳定的条带。共扩增出的条带大小在 100 ~ 2 500 bp 之间, 条带数在 4 ~ 14 之间。选用的引物组合在雌性基因组 DNA 上共扩增出 139 条带, 平均每对引物可扩增出 8.2 条带; 在雄性基因组 DNA 上共扩增出 129 条带, 平均每对引物可扩增出 7.6 条带。图 1 为 SRAP 引物筛选后正式扩增的电泳图谱。对筛选中有差异的引物 (图 2, 图 3) 重复实验以确定扩增产物的稳定性。

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16 17

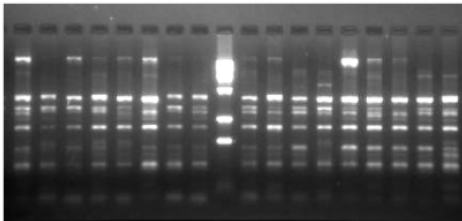


图 1 m8-em9 在雌、雄个体间的扩增图谱
Fig. 1 Amplified result of females and males in m8-em9 of SRAP primer pairs
M. DL2000 marker; 1-8. 雄蟹; 9-17. 雌蟹。

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16 17

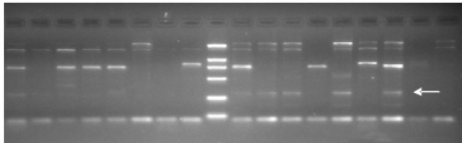


图 2 m3-em8 在雌、雄个体间的扩增图谱
Fig. 2 Amplified result of females and males in m3-em8 of SRAP primer pairs
M. DL2000 marker; 1-8. 雄蟹; 9-17. 雌蟹。

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16 17

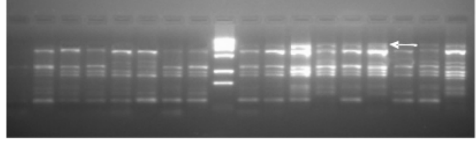


图 3 m8-em4 在雌、雄个体间的扩增图谱
Fig. 3 Amplified result of females and males in m8-em4 of SRAP primer pairs
M. DL2000 marker; 1-8. 雄蟹; 9-17. 雌蟹。

2.2 梭子蟹雌、雄个体的遗传差异

用 17 个 SRAP 引物组合在梭子蟹雌、雄个体中共检测到 146 个位点, 其中雌性个体 139 个位点, 多态位点比例为 69.78%; 雄性个体共检测到 129 个位点, 多态位点比例达到 79.07%, PopGene (Version 3.2) 软件统计结果见表 2。

表 2 梭子蟹雌、雄群体的分子遗传分析
Tab. 2 Molecular genetic analysis of female and male populations of *Portunus trituberculatus*

群体	多态位点比例 (<i>P</i>)	有效等位基因数 (<i>Ne</i>)	Nei's 基因多样性指数 (<i>H</i>)	Shannon 多样性指数 (<i>I</i>)
雌性群体	69.78%	1.402 2	0.231 5	0.347 8
雄性群体	79.07%	1.462 8	0.268 2	0.402 6

结果表明梭子蟹的雌、雄个体间在基因组 DNA 水平上具有较明显的差异, 但是在大多数位点在雌雄间的差异仅表现为个体间的差异 (图 1), 具体表现在个体间在 SRAP 某一位点的基因型为显性或隐性, 没有发现能够通过基因型将全部雌性和雄性个体鉴别开来的特异位点。但在 5 个 SRAP 选择扩增组合中发现了 6 个位点在雌雄个体的扩增差异较大, 其中 4 个位点显性基因型为雄性个体比例的 12.5% ~ 20%, 2 个位点表现显性基因型完全为雌性所特有 (图 2, 图 3), 但在雌性个体中的显性条带的扩增比例却只有 55.6%。位点的编号及显性基因型中雌、雄个体所占比例见表 3。

用 TFGPA 软件包计算了梭子蟹雌、雄个体间的遗传相似系数为 0.595 9 ~ 0.841 7, 遗传距离为 0.158 3 ~ 0.404 1, 用 UPGMA 方法绘制了个体间聚类图 (图 4)。从聚类图可以看出, 多数雌性个体遗传距离较近, 优先聚类, 而雄性个体与雌性个体距离较远。

表 3 特异位点及显性基因型雌雄所占的比例
Tab.3 Specific loci and female and male ratio in dominant genotype

位点	雌性个体 ♀	雄性个体 ♂
m3-em8-1	87.5%	12.5%
m3-em8-4	100%	0
m6-em4-1	66.7%	33.3%
m8-em3-2	85.7%	14.3%
m8-em4-1	100%	0
m8-em9-8	80%	20%

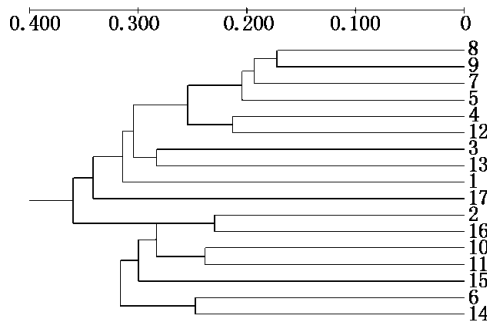


图 4 三疣梭子蟹雌雄个体的聚类图

Fig. 4 UPGMA of female and male individual of

Portunus trituberculatus

1-9. 雌性个体; 10-17. 雄性个体。

3 讨论

梭子蟹是我国大型的海产经济蟹类,现阶段对梭子蟹的苗种培育、人工养殖技术及疾病防治等方面进行了较多的研究,而有关梭子蟹种群遗传结构的研究开展得较晚,主要集中于梭子蟹野生群体遗传结构及种质资源的鉴定方面,同工酶^[13-18]、mtDNA^[19-21]、ISSR^[18]、RAPD^[22]、AFLP^[23]等分子标记的应用加速了梭子蟹遗传基础研究进程,已经分离出能够区分不同种梭子蟹的分子标记^[22]。

同龄性成熟的梭子蟹雌、雄个体差异较大。在自然状态下,尽管雄蟹大于雌蟹,但是雌蟹的经济价值高出雄蟹数倍。对于梭子蟹雌、雄个体的遗传差异的分子机制研究尚未发现报道。由于同工酶及蛋白均为基因表达的产物,受生理及环境的影响较大,作为遗传标记具有一定的局限性^[13-18]。梭子蟹雌、雄个体在基因组 DNA 水平的差异目前尚无报道。本研究用 SRAP 分子标记分析梭子蟹雌、雄个体的遗传差异,结果表明,梭

子蟹雌、雄个体间的遗传差异较大,这种差异主要表现在个体间,其中 4 个位点表现出雌、雄扩增比例差异较大的现象。能够根据位点显性基因型鉴别出一定比例的雌性个体或雄性个体,例如 m3-em8-1 位点检测到基因型为显性的个体中雄性的比例为 12.5%,m3-em8-4 和 m8-em4-1 位点扩增结果显性基因型为雄性的比例达到 100%,但却只能鉴别出 55.6% 的雌性个体,没有发现能够完全鉴别梭子蟹雌、雄个体的位点。雌雄个体的聚类结果也表明雌雄个体具有一定的遗传分化,但在某些个体出现交叉聚类。

SRAP 标记技术可产生分布整个基因组的分子标记,具有位点丰富、简便、高效等优点,非常适合应用于遗传差异较小的种系鉴定及筛选与目的基因连锁的分子标记。应用 SRAP 技术进行种质和性别鉴定的研究在植物^[8]和鱼类^[24-25]均有报道。由于本研究检测的个体数及位点数均较少,与使用的电泳技术有关。如果能够使用 PAGE 电泳分离,增加引物扩增组合的数量,检测更多的位点,有可能找到能够完全鉴别梭子蟹雌雄个体的标记。

参考文献:

- [1] 樊晓旭,王春琳,朱冬发,等. 三疣梭子蟹雌性化育苗技术的研究[J]. 海洋水产研究,2008,29(5): 89-94.
- [2] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet,2001,103: 455-461.
- [3] Ferriol M, Pico B, Cordava P F. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP marker [J]. Crop Science, 2004,(44): 653-664.
- [4] 潘俊松,王刚,李效尊,等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J]. 自然科学进展,2005,15(2): 167-172.
- [5] 柳李旺,龚义勤,黄浩,等. 新型分子标记 TRAP 与 SRAP 及其应用[J]. 遗传,2004,26(5): 777-781.
- [6] 林忠旭,张献龙,聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F₂ 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J]. 遗传学报, 2004,31(6): 622-628.
- [7] 张志伟,韩曜平,仲霞铭,等. 草鱼野生群体和人工繁殖群体遗传结构的比较研究[J]. 中国水产科学,2007,14(5): 720-725.
- [8] 吴文珊,朱晓东,陈友铃,等. 与蒺藜性别相关的 SRAP 分子标记[J]. 应用与环境生物学报,2008,14(5): 688-691.

- [9] 邱涛,陆仁后,项超美,等.用 RAPD 技术识别中华绒螯蟹性别差异[J].水产学报,1996,22(2):175-177.
- [10] 王艺磊,戴军,姚扬烈,等.利用 AFLP 技术筛选锯缘青蟹性别差异 DNA 片段[J].中国水产科学,2004,11(4):286-290.
- [11] 李喜莲.三疣梭子蟹线粒体 DNA 多态性研究[D].陕西:西北农林科技大学,2007:7.
- [12] 王燕青,季孔庶.利用正交设计优化牡丹 SRAP-PCR 反应体系[J].分子植物育种,2009,7(1):199-203.
- [13] 李鹏飞,刘萍,李健,等.莱州湾三疣梭子蟹的生化遗传分析[J].海洋水产研究,2007,28(2):90-96.
- [14] 余红卫,朱冬发,韩宝芹.三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析[J].动物学杂志,2005,40(1):84-87.
- [15] 朱冬发,余红卫,王春琳.三疣梭子蟹个体发育早期的同工酶谱变化[J].水产学报,2005,29(6):751-756.
- [16] 王国良,金珊,李政,等.三疣梭子蟹养殖群体同工酶的组织特异性及生化遗传分析[J].台湾海峡,2005,24(4):474-480.
- [17] 高保全,刘萍,李健,等.三疣梭子蟹野生群体同工酶的遗传多态性分析[J].水产学报,2007,31(1):1-6.
- [18] 陈淑吟,吉红九,丁亚平,等.吕泗渔场三疣梭子蟹自然群体同工酶与 ISSR 遗传多样性分析[J].上海水产大学学报,2008,17(4):406-410.
- [19] 王敏强,崔志峰,刘晓玲,等.2 种三疣梭子蟹居群线粒体 b 和 S-rRNA 基因片段序列变异研究[J].烟台大学学报:自然科学与工程版,2008,21(3):191-197.
- [20] 郭天慧,孔晓瑜,陈四清,等.三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究[J].中国海洋大学学报,2004,34(1):22-28.
- [21] 张妹,李喜莲,崔朝霞,等.线粒体基因片段在梭子蟹系统发育及物种鉴定中的应用[J].海洋科学,2008,32(4):9-18.
- [22] 金珊,赵青松,王春琳,等.梭子蟹科六种海产蟹的 RAPD 标记[J].动物学研究,2004,25(2):172-176.
- [23] 刘爽,薛淑霞,孙金生.黄海和东海三疣梭子蟹(*Portunus triuberbulatus*) 的 AFLP 分析[J].海洋与湖沼,2008,39(2):152-156.
- [24] 丁炜东,曹丽萍,曹哲明.草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记[J].动物学报,2008,54(3):475-481.
- [25] Ding W D, Cao Z M, Cao L P. Molecular analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by SRAP and SCAR molecular markers[J]. Aquacult Int, 2010, 18(4): 575-587.